

突变人 CD59 分子糖基化前后抗补体活性的变化

任书荣, 高美华

(青岛大学医学院免疫学教研室, 山东省青岛市 266021)

[关键词] 分子生物学; 突变人 CD59 抗补体活性的变化; 真核表达; 基因定点突变; CHO 细胞; 染料释放试验; 糖基化

[摘要] 目的 探讨 2 种突变 CD59 分子(HM3、HM4)糖基化前后抗补体活性的变化, 为糖尿病血管增殖的发生机制提供理论基础。方法 采用重组聚合酶链反应定点诱变技术在 CD59 易于糖基化的位点“41 位赖氨酸—44 位组氨酸”将 44 位的组氨酸基因位置改变, 构建 2 种不同的 CD59 突变基因, 克隆入真核表达质粒 pALTER-MAX。利用阳离子脂质体将重组质粒和 pcDNA3 共转染中国仓鼠卵巢巢细胞。G418 筛选稳定转染细胞克隆, 免疫标记技术检测筛选突变 CD59 基因蛋白高表达株。染料释放实验检测突变 CD59 分子糖基化前后抗补体活性。结果 序列测定及酶切鉴定均证实成功构建了 pALTER-突变 CD59 重组真核表达载体系统。经酶免疫组织化学、荧光免疫组织化学和流式细胞术鉴定出较高表达突变 CD59 分子的阳性细胞克隆。免疫印迹技术检测出阳性细胞克隆裂解液中有 1 条相对分子质量约 20 000 的 CD59 蛋白表达带。染料释放实验初步证实突变 CD59 分子具有抗补体活性, 糖基化后抗补体活性明显降低。结论 2 种突变 CD59 分子均具有抗补体活性, 高糖环境下易被糖基化, 糖基化后抗补体活性明显降低, 为进一步研究糖尿病血管增殖的发生机制提供了线索。

[中图分类号] R392

[文献标识码] A

Changes of Anticomplement Function of Human Mutant CD59 before and after Glycation

REN Shu Rong, and GAO Mei Hua

(Department of Immunology, Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao 26602, China)

[KEY WORDS] CD59; Eukaryotic Expression System; Site Directed Mutagenesis; CHO; Dye Release Tests; Functional Assays; Glycation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether glycation could inhibit the protection role of mutant CD59s against human complement. **Methods** Site-directed mutagenesis to replace residue 37 or 38 with histidine (H) was performed by recombinant PCR. Mutant CD59 DNAs were inserted into the mammalian expression vector pALTER-MAX and transfected into CHO together with the selection marker pcDNA3, which conferred resistance to G418. Expression of mutant CD59s in the G418-resistant clones were tested by Western blot, immunohistochemistry and FCM. A functional dye release assay was used to measure protection role of CD59s against human complement. **Results** Recombinant plasmids of pALTER-HM CD59 had been successfully constructed according to sequence and enzyme digestion analysis. Stable transfectants were selected by the addition of G418. Stable populations of CHO cell, which expressed relatively high levels of recombinant protein, were sorted by immunolabeled technique. In Western blot assay, the mutant proteins expressed on CHO was about 20 kDa. Dye release assays confirmed both mutants still preserved CD59 activity of anticomplement, and glycation of CD59 in CHO increased their sensitivity to MAC-mediated lysis. **Conclusions** Residues by Site-directed mutagenesis to replace residue 37 or 38 with histidine still preserved CD59 activity of anticomplement. Mutant CD59s can be glycosylated in vitro and loses its most MAC-inhibitory function. The presence of this glycation motif in human mutant CD59, may help explain the distinct propensity of humans to develop vascular proliferative complications of diabetes.

小血管和微血管增殖性病变是糖尿病患者致残致死的主要原因之一。近年来报道人类糖尿病血管增殖并发症的发生与补体调节蛋白——CD59 糖基化后失活有关^[1]。人 CD59 是一种广泛分布于各种

组织细胞表面的 GPI 锚固型糖蛋白, 可抑制补体膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC) 插入细胞膜脂质双层, 是保护正常细胞免受 MAC 作用的重要因子之一。核磁共振证实, CD59 存在易于糖基化失活的位点赖氨酸(lysine, K) 41—组氨酸(histidine, H) 44^[2]。由于 H 和 K 之间距离不同, 使得 CD59 对糖基化的敏感性不同。本研究旨在获得 2 种糖基化结构位点改变的突变 CD59, 观测突变分子在高糖环境下抗补体活性的变化, 以期从另一角度探讨糖尿病患者血管内皮细胞发生增殖的机制。

[收稿日期] 2005-03-15 [修回日期] 2005-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30170893)

[作者简介] 任书荣, 硕士, 讲师, 主要从事分子免疫学研究, 联系电话为 0532-82768903, E-mail 为 renshurong@yahoo.com.cn。通讯作者高美华, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子免疫学研究, 联系电话为 0532-82991711, E-mail 为 meihuagao@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

真核表达载体 pALTER-MAX 购自 Promega 公司, 含有 CMV 强启动子序列; 共转染质粒 pcDNA3 购自 Invitrogen 公司; 含正常人 CD59cDNA-pALTER 重组质粒由美国哈佛大学医学院提供, 该重组质粒含有 T7、T3 RNA 聚合酶启动子, EcoR I 酶切位点, CD59 信号肽、CD59 cDNA 序列: 大肠杆菌 DH5 α 由本室保存; 中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO) 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所。限制性内切酶 EcoR I 购自 Takara 公司; RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; 胰酶和 G418 均购自 Amresco 公司; CD59 单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb)-FITC 购自 Coulter 公司; 羊抗人 CD59 多克隆抗体购自 SCB 公司; 辣根酶标记兔抗羊 IgG 购自北京中山生物技术有限公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 2, 7-二羧乙基-5, 6 羧基荧光素 (BCECF) 购自 Sigama Aldrich 公司; 兔抗 CHO 抗体由本室自制。

1.2 引物设计

拟突变 CD59 与正常 CD59 分子之间差别为 HM3: K38 突变为 H38, 相应密码子 AAG(K) 突变为 CAT(H); HM4: 37 位天冬酰胺 (asparagines, N) 突变为 H37, 相应密码子 AAC(N) 突变为 CAC(H)。共合成 3 对引物 (表 1): 常规上下游引物 (pT7, T3) 根据待插入 CD59 cDNA 模板两侧 T7、T3 RNA 聚合酶启动子序列设计; 每种突变基因再合成 1 对带有诱变位点的互补寡核苷酸引物 (3/F、3/R、4/F、4/R), 错配碱基位于中央。

表 1. 基因定点突变所需引物名称及序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	核苷酸数
pT7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	20
T3	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3'	20
3/F	5'-ACAAGTGATAAC CAT TGTTGGAAGTTT-3'	28
3/R	5'-AAGTTCCAACA ATG GTTATACACTTGTA-3'	28
4/F	5'-GTTACAAGTGAT CAC AAGTGTGGAAG-3'	28
4/R	5'-CTTCCAACACIT GTG ATACACITGTAAG-3'	28

1.3 目的基因的获得及纯化

以含 CD59 cDNA-pALTER 重组质粒为模板, 和

上述引物经 3 次聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增获得目的基因 HM3 和 HM4。PCR iv: 引物为 pT7 和 3/R 或 4/R, 扩增诱变的 DNA 片段 3-1 或 4-1。在 40 μ L 的反应体系中, 含有质粒 DNA 模板 (1: 100 稀释) 2 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 4 μ L, 4 \times dNTP 4 μ L, Taq 酶 2 μ L, 引物 pT7 和 3/R 或 4/R 各 2 μ L, ddH₂O 24 μ L。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 56 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR ⑤引物为 T3 和 3/F 或 4/F, 扩增诱变的 DNA 片段 3-2 或 4-2, 其他条件同 PCR iv。PCR ⑥将纯化 PCR iv 和 PCR ⑤产物等量混合为模板, pT7 和 T3 为引物, 扩增获得完整的含诱变位点的目的基因片段 HM3、HM4。在 120 μ L 的反应体系中, 含有 3-1/3-2 或 4-1/4-2 模板 3 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 12 μ L, 4 \times dNTP 12 μ L, Taq 酶 6 μ L, 引物 pT7 和 T3 各 6 μ L, ddH₂O 75 μ L。反应参数同上。

1.4 重组真核表达体系的构建及鉴定

纯化 HM3、HM4 PCR 产物和 pALTER-MAX 载体均 EcoRI 酶切, 纯化回收试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit) 纯化回收酶切产物, T₄ 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 含氨苄青霉素固体培养基筛选转化子, 经 PCR 筛选、酶切鉴定获得重组真核表达质粒 pALTER-HM3 和 pALTER-HM4, 并经测序验证。

1.5 稳定转染中国仓鼠卵巢细胞细胞系的建立

中国仓鼠卵巢细胞用含 100 g/L 小牛血清、100 ku/L 青霉素和链霉素的 RPMI-1640 常规细胞培养, 采用 pcDNA3 和重组质粒进行共转染, 转染试剂为 Lipofectamine 2000, 具体方法参照说明书进行。继续培养 24~48 h 后经 500 mg/L G418 压力筛选, 10~14 天套取筛选出的单克隆细胞扩大培养, 细胞培养基中 G418 浓度维持在 400 mg/L。

1.6 转染中国仓鼠卵巢细胞阳性克隆的筛选

采用荧光免疫组织化学 (fluorescence immunohistochemistry, FIH)、酶免疫组织化学 (enzyme immunohistochemistry, EIH) 和流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 直接染色法检测中国仓鼠卵巢细胞膜表面 CD59 分子的表达。细胞裂解液中 CD59 分子的检测须冰浴配制细胞裂解液裂解细胞以获得含有突变 CD59 分子的溶液, 进一步行免疫印迹技术观察是否在相应位置出现 CD59 蛋白表达条带。

1.7 突变 CD59 分子抗补体活性的检测

采用荧光染料释放试验。表达 HM3、HM4 和空质粒 pALTER 转染对照细胞均接种于 96 孔培养板培养, 对照组培养基为含 G418 的 RPMI-1640, 糖化

组培养基另加 50 mmol/L 的核糖孵育, 氨基氢硼化钠作用 20 min。每孔加入 2 mg/L BCECF 染料, 37 °C 30 min。洗涤细胞 2 次, 加入 56 °C 灭活的 1: 500 稀释的兔抗 CHO 抗体 30 min。洗涤后, 各孔分别加入 1: 1、1: 2、1: 4 和 1: 8 稀释的新鲜血清各 100 μ L, 各稀释度血清均做复孔, 37 °C 15~30 min。取上清, 孔底细胞用 Triton-100 裂解, 上清液和裂解液分别测定荧光强度(激发光 503 nm, 发射光 530 nm), 染料释放率= 上清液荧光强度 \times 100 / (上清液荧光强度 + 裂解物荧光强度)。

1.8 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 HM3 和 HM4 真核表达体系的构建

重组 PCR 定点诱变技术获得目的基因片段, 扩增产物克隆入真核表达载体 pALTER-MAX, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒行 EcoR I 酶切和测序, 均证实成功构建了重组质粒 pALTER-HM3 和 pALTER-HM4(图 1)。

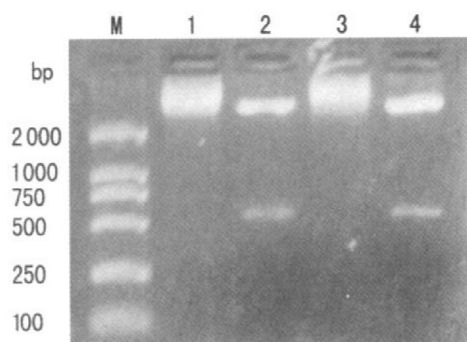


图 1. 重组质粒(pALTER-HM3/HM4) EcoR I 酶切鉴定 1 和 3 为未酶切图谱, 2 和 4 为酶切后图谱。

2.2 重组质粒转染中国仓鼠卵巢细胞及筛选

采用重组质粒和 pcDNA3 共转染中国仓鼠卵巢细胞, 转染后 48 h 加入 G418 筛选转染成功的阳性细胞, 随着时间推移可见大量细胞从瓶壁脱落, 逐渐死亡。其间可见少量散在细胞生长, 筛选约 2 周后开始出现细胞克隆, 将所得 G418 抗性克隆随机挑取数个逐步扩大培养。

2.3 阳性细胞克隆的鉴定筛选

与对照组比较, 加 CD59McAb-FITC 组不同的细胞克隆细胞表面荧光强度强弱不一, 选取荧光较强组培养(图 2); 间接 EIH 可见染成棕褐色的阳性克隆细胞, 空载体转染细胞染色较阳性染色细胞显色

浅。FCM 检测结果见图 3, 同型对照和阴性 CHO 细胞荧光图形基本相似, HM3、HM4 细胞荧光染色后峰值明显右移, 阳性率分别为 42.8% 和 55.9%。Western blot 结果发现 HMCD59 阳性细胞克隆在约 20 kDa 位置出现 1 条较明显显色区带(图 4)。

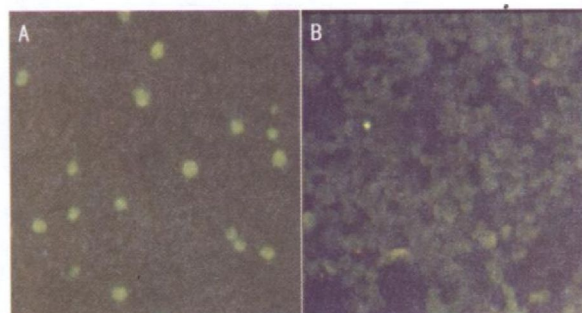


图 2. 荧光免疫组织化学检测 HM3/HM4 在 CHO 细胞中的表达 A 为 HM3/HM4 表达阳性细胞, B 为空载体转染阴性细胞。

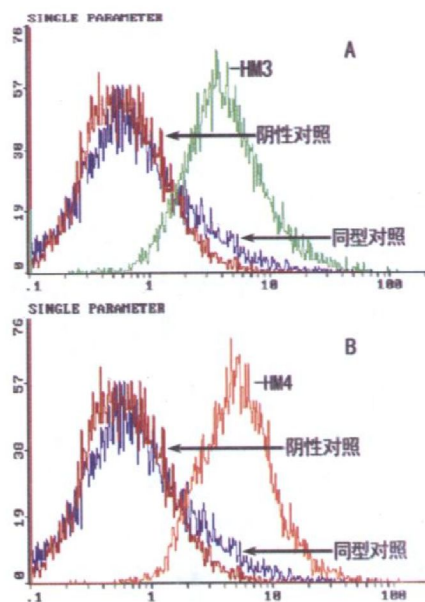


图 3. 流式细胞术检测 HM CD59 表达阳性克隆图谱 A 为 HM3 克隆, B: 为 HM4 克隆。

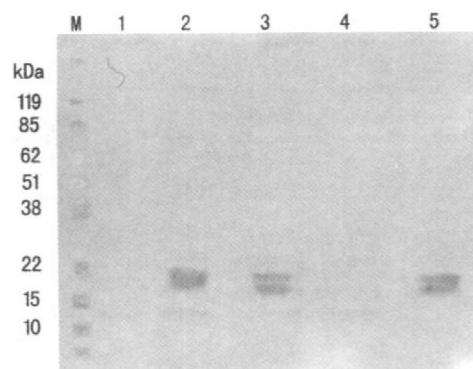


图 4. 表达蛋白的免疫印迹技术检测 1 为阴性细胞对照, 2 为 HM3 阳性克隆, 3 为 HM3 阳性克隆, 4 为 HM4 阴性克隆, 5 为 HM4 阳性克隆。

2.4 糖化前后突变 CD59 分子抗补体活性的比较

与空质粒转染细胞相比较, HM3 和 HM4 阳性细胞克隆染料释放率均明显降低, 糖化后释放率升高 ($P < 0.05$), 但仍低于空质粒转染细胞 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2. 不同补体稀释倍数时 HM3 和 HM4 表达阳性中国仓鼠卵巢细胞糖基化前后染料释放率 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	1: 8	1: 4	1: 2	1: 1
HM3 阳性细胞				
糖基化前	31.3 \pm 3.2 ^b	43.2 \pm 3.4 ^b	48.4 \pm 2.6 ^b	58 \pm 2.4 ^b
糖基化后	61.4 \pm 3.4 ^{ab}	73.4 \pm 3.2 ^{ab}	75.1 \pm 4.3 ^{ab}	77.8 \pm 2.1 ^{ab}
HM4 阳性细胞				
糖基化前	27.6 \pm 2.0 ^b	35.9 \pm 3.0 ^b	40.4 \pm 2.2 ^b	50.1 \pm 3.2 ^b
糖基化后	42.6 \pm 4.1 ^{ab}	46.8 \pm 3.4 ^{ab}	50.5 \pm 1.9 ^{ab}	60.0 \pm 2.8 ^{ab}
CD59 阴性细胞				
糖基化前	64.2 \pm 4.8	74.1 \pm 2.9	77.1 \pm 3.3	88.4 \pm 3.2
糖基化后	65.6 \pm 3.7	77.7 \pm 3.5	80.4 \pm 4.4	93.9 \pm 4.5

a 为 $P < 0.05$, 与糖基化前相应细胞比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CD59 阴性细胞比较。

3 讨论

目前全世界糖尿病患病率逐年提高, 而糖尿病血管增殖症是严重危害糖尿病患者的并发症, 对其发病机制进行了大量探讨, 但目前尚无明确结论。近来, 高糖环境下 CD59 糖基化灭活与糖尿病血管增殖症发生有关的认识受到重视^[1]。

通过对 CD59 结构及功能的研究揭示^[2,3], 糖尿病患者易于发生血管增殖症, 可能与存在突变的 CD59 分子有关, 后者在高糖环境下易于糖基化而失去抗补体活性, 不能抑制 MAC 形成而引起血管增殖症^[4,6]。本课题共构建 2 种可能存在的突变体。本研究采用 PCR 定点诱变法, 经 3 次 PCR 扩增而获得突变目的基因。此方法为一种高效定点诱变方法, 使体外定点突变既简便又省时。本实验利用阳离子脂质体法将外源质粒导入 CHO 细胞, 转染所需的 DNA 用量少, 转染效率较高, 转染快速^[7]。

2 种突变 CD59 分子结构变化与正常 CD59 分子之间差别为:

	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
正常 CD59	N	K	C	W	K	F	E	H	C	N
突变 3 号(HM3)	N	H	C	W	K	F	E	Q	C	N
突变 4 号(HM4)	H	K	C	W	K	F	E	Q	C	N

字母含义: N 为天冬酰胺, H 为组氨酸, C 为半胱氨酸, W 为色氨酸, K 为赖氨酸, F 为苯丙氨酸, E 为谷氨酸, Q 为谷氨

酰氨, C 为半胱氨酸, N 为天冬酰胺。

即突变 CD59 分子 37 或 38 位氨基酸突变为组氨酸(H), 框内 KFEH 为核磁共振证实糖基化位点。HM3 为: H38—W40—K41; HM4: H37—W40—K41。理论上在突变 CD59 分子中, H38、H37 靠近 K41, 使得 K41 易于糖基化, 从而影响 CD59 发挥功能的一个必需的保守氨基酸 W40, 即突变 CD59 分子 K41 可被糖基化, 糖基化后可干扰其抗补体活性。但由于经基因转录、翻译、蛋白质的加工处理, 可使蛋白质的空间结构发生改变, 而影响其功能的发挥。实际情况中, 尚无法得知以一个氨基酸取代另一个氨基酸究竟只涉及活性部位的结构和功能, 还是会对全局发生更大影响^[8]。故对突变 CD59 分子的功能需经一系列实验测定。

本课题通过染料释放试验测定稳定表达突变 CD59 分子的 CHO 细胞对补体介导的溶细胞作用的敏感性。功能性 CD59 可抑制 MAC 形成, 保护细胞免受损伤。因此可通过染料释放率反应 CD59 活性。释放率与 CD59 抗补体活性呈负相关。表达突变 CD59 分子的细胞其染料释放率降低, 糖基化后染料释放率升高。说明突变 CD59 分子具有抗补体活性, 且易于糖基化, 糖基化后抗补体活性降低。证实组氨酸移位至 37、38 位仍能协助赖氨酸糖基化灭活。纯化后人类突变 CD59 糖基化前后功能研究将在以后的实验中继续探讨。

[参考文献]

- [1] Juan A, Judith H, Rudolf, Nicole K, Allison G, Luis A, et al. Molecular basis for a link between complement and the vascular complications of diabetes[J]. *PNAS*, 2000, **97**(10): 5 450-455
- [2] Bodian DL, Davis SJ, Morgan BP, Rushmere NK. Mutational analysis of the active site and antibody epitopes of the complement-inhibitory glycoprotein, CD59[J]. *J Exp Med*, 1997, **185**(3): 507-516
- [3] Yu J, Abagyan R, Dong S, Gilbert A, Nussenzweig V, Tomlinson S. Mapping the active site of CD59[J]. *J Exp Med*, 1997, **185**(4): 745-753
- [4] Halperin JA, Tarataska A, Anicholson Weller A. Terminal complement complex C5b-9 stimulates mitogenesis in 3T3 cell[J]. *J Clin Invest*, 1993, **91**(5): 1 974-978
- [5] Torzewski J, Oldroyd R, Lachmann P, Fitzsimmons C, Proudfoot D, Bowyer D. Complement-induced release of monocyte chemoattractant protein-1 from human smooth muscle cell. A possible initiating event in atherosclerotic lesion formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**(5): 673-677
- [6] Benzaquen LR, Nicholson Weller A, Halperin JA. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cell[J]. *J Exp Med*, 1994, **179**(3): 985-992
- [7] 刘录山, 张善春, 尹卫东, 危当恒, 王贵学, 蔡绍哲, 等. 脂质体介导血管内皮生长因子基因在内皮细胞的稳定表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**(2): 118-121
- [8] 萨鲁布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯著 T, 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版. 北京: 科学技术出版社, 1996: 741-742 (此文编辑 朱雯霞)